

网络出版时间:2025-11-28 11:10:14 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260129.0856.014

TRIM28 高表达在非 M3 型急性髓性白血病中的预后意义

龚思琪¹,李丛¹,范蒙蒙¹,王会平¹,张婉秋¹,梁雪¹,陶千山¹,洪强²,翟志敏¹

(¹安徽医科大学第二附属医院血液科,合肥 230601;²安徽医科大学基础医学院,合肥 230032)

摘要 目的 阐明 TRIM28 在非 M3 型急性髓性白血病(AML)中的表达及其与临床指标和预后的相关性,并利用小干扰 RNA 技术进一步探讨 TRIM28 表达水平对 AML 细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过 R 语言分析 GSE34577 数据集对比正常人及非 M3 型 AML 患者 TRIM28 表达。收集非 M3 型 AML 的患者临床样本,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 TRIM28 在非 M3 型 AML 患者中的表达水平,并分析其与临床指标的相关性、疗效与预后。利用小干扰技术以干涉人源 AML 细胞(HL60 细胞系)的 TRIM28 水平,并用 CCK-8 和流式细胞术分别检测细胞增殖和凋亡情况。结果 TRIM28 在临床样本和 GSE34577 数据集的非 M3 型 AML 样本中均上调($P < 0.0001$),初诊组和复发难治组的 TRIM28 表达高于缺铁性贫血组($P < 0.01$),不同法美英分型系统亚型之间无显著性差异,遗传学预后分层为中等的不良的非 M3 型 AML 患者 TRIM28 表达高于预后良好组,且 TRIM28 表达与 NPM1 合并 FLT3-ITD 突变有关;与年龄、骨髓原始细胞、外周血原始细胞、白细胞计数呈正相关;与血红蛋白负相关。此外,干扰 TRIM28 能显著抑制 HL60 细胞增殖,促进细胞凋亡。结论 TRIM28 在非 M3 型 AML 中高表达并与预后相关,并在 AML 细胞的增殖和凋亡中起关键作用,提示 TRIM28 可能成为非 M3 型 AML 新的治疗靶点。

关键词 非 M3 型急性髓性白血病;TRIM28;增殖;细胞凋亡;复发;预后

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2026)02-0301-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.016

急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种髓系来源的造血干细胞的恶性克隆性疾病,其特征是骨髓内异常细胞的快速增殖并同时伴感染、贫血和出血等症状^[1]。全球每年有 8 万多人死于 AML,由造血功能异常引起的一系列血液变化是其主要死亡原因^[2]。近年来治疗手段不断进步,M3 型 AML 在临床已有较好治疗方案且早期完全缓解(complete response, CR)率可达 90% 以上,但是非 M3 型患者预后仍不理想,大多数患者依然面临着复发、难治,最终病情进展恶化的问题,新型有效的治疗靶点有待进一步探索。

三基序蛋白(tripartite motif-containing protein, TRIM)家族是一类进化上保守的蛋白质^[3],在肿瘤发生的早期阶段,代谢重编程、肿瘤微环境变化以及活性氧失衡等一系列因素可促进细胞发生恶性转化^[4]。TRIM28,又称 KRAB 相关蛋白 1(KRAB-

associated protein 1, KAP1)^[5],是 TRIM 家族的重要成员。TRIM28 在胚胎干细胞及多种肿瘤中表达升高,可调节细胞分化及凋亡在内的多种细胞功能^[6],被认为是白血病的有效治疗靶点^[4]。该研究旨在检测 TRIM28 在非 M3 型 AML 患者中的表达水平,并探讨其在非 M3 型 AML 中的预后意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 纳入 2020 年 4 月至 2025 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院诊断为非 M3 型 AML 的患者 75 例,4 例治疗无缓解(non-remission, NR)患者未纳入表 1,无先天性/获得性免疫缺陷。选取 20 例骨髓检查无异常的缺铁性贫血(iron deficiency anemia, IDA)患者作为正常对照骨髓标本。根据 WHO(2016)MICM 分类诊断的患者分为初诊(new diagnosis, ND)、CR 和复发难治(relapsed refractory, RR)。这些患者的详细临床资料见表 1。本研究经安徽医科大学第二附属医院医学研究伦理委员会批准(批号:SL-YX[YS]2023-SZR 039)。所有参与研究的患者均签署了知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 1640 RPMI 培养基(上海源培生物科技股份有限公司,货号:L210KJ),细胞总 RNA 快提试剂盒(广州信天翁生物科技有限公

2025-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82370225);安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH053176);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2023zhxy-B08)

作者简介:龚思琪,女,硕士研究生;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail:zzzm889@163.com

表1 非M3型AML患者特征
Tab. 1 Characteristics of non-M3 AML patients

State of disease at sample draw	IDA	ND	CR	RR
Number of patients (<i>n</i>)	20	27	15	29
Male [<i>n</i> (%)]	8 (40.00)	12 (44.44)	6 (40.00)	14 (48.28)
Female [<i>n</i> (%)]	12 (60.00)	15 (55.56)	9 (60.00)	15 (51.72)
Average age [Mean (Range), years]	46.2 (35-68)	59.1 (20-85)	52.2 (16-72)	51.2 (16-82)

司,货号:400-100),ToloScript All-in-one RT Easy-Mix for qPCR、2 × Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) (上海吐露港生物科技有限公司,货号:22107、22204),BCA蛋白定量试剂盒、CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0010S、C0041),ECL化学发光剂(美国Thermo Fisher公司,货号:34577),AnnexinV-APC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,货号:BB-41033)。TRIM28和GAPDH的PCR引物(南京擎科生物科技有限公司),GAPDH Rabbit pAb、TRIM28 Rabbit pAb(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:AC001、A2245),山羊抗兔IgG HRP(合肥麦客生物科技有限公司,货号:BL101A)。实时荧光定量PCR(上海罗氏诊断产品有限公司,型号:Light Cycler480),凝胶成像仪(广州博鹭腾生物科技有限公司,型号:GelView 6000 Pro II),流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司,型号:Cyto Flex)

1.3 骨髓单个核细胞提取 用肝素抗凝管采集血液样本,1 500 r/min离心5 min,弃去上层血浆。将剩余沉淀与等体积无菌PBS混匀,转入15 mL离心管。将稀释后的血样小心加入至淋巴分离液上层,2 000 r/min离心30 min(升降速均设为1),离心后分为4层。取第2层淋巴细胞白环层至含生理盐水的离心管中,1 500 r/min离心10 min,获得单核细胞沉淀。

1.4 实时定量PCR 收集上述单个核细胞,用细胞总RNA快提试剂盒提取总RNA,用分光光度计测定浓度,用DEPC水校准。将该RNA作为反转录模板,得到的cDNA进行qPCR扩增,以GAPDH作为内参检测TRIM28 mRNA的相对表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算TRIM28相对表达量,基因引物序列如表2所示。

1.5 蛋白质免疫印迹法 取生长状态好的细胞收集沉淀,加入适量细胞裂解液(RIPA:PMSF=100:1)提取蛋白,并进行BCA蛋白定量分析,提取的蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后进行转膜,用脱脂牛奶封闭2 h;封闭结束,洗膜后进行抗体孵育。一

抗如表3所示。暴露于ECL后,使用ImageJ软件进行灰度值分析。

表2 用于qPCR引物的引物
Tab. 2 Primers used for qPCR

Name	Sequence (5'-3')
GAPDH-Forward	AGCAAGAGCACAAAGAGGAAG
GAPDH-Reverse	GGTTGAGCACAGGCTACTTT
TRIM28-Forward	GCGGAAATGTGACCGCTGTA
TRIM28-Reverse	CCTGGCCAAACTCTGT

表3 Western blot所用一抗
Tab. 3 Primary antibodies used for Western blot

Antibody	Company	Catalog number
GAPDH Rabbit pAb	ABclonal	AC001
KAP1/TRIM28 Rabbit pAb	ABclonal	A2245

1.6 细胞复苏和培养 将冻存的HL-60细胞在37 °C水浴锅中解冻然后在室温下用PBS缓冲细胞,在800 r/min下离心5 min以去除冻存液,然后在含有10% FBS的RPMI-1640培养基中重悬,转移到T25培养瓶中,培养温度为37 °C,CO₂浓度为5%。

1.7 si-RNA转染 取生长状态良好的细胞,以每孔 2×10^5 个细胞/400 μL的密度接种于24孔板中。用培养基稀释4种不同序列的病毒和转染剂lip3000。将稀释后的病毒加入稀释后的lip3000中,得到最终的转染液,室温孵育20 min。每孔加入转染液,在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。在24~48 h通过qPCR验证转染效率,在48~72 h通过蛋白水平验证转染效率。

1.8 CCK-8实验 每组细胞在1 500 r/min下离心5 min,获得细胞沉淀,将含10% FBS的完全培养基重悬细胞。按照每孔6 000个/100 μL的体系接种于96孔板中。每组细胞重复5个复孔,分别于0、24、48、72 h加入10 μL CCK-8溶液,然后在37 °C、5% CO₂培养箱中孵育1~2 h。在450 nm波长处测量每组每孔细胞的吸光度值A,记录数据并计数。

1.9 凋亡检测 采集细胞并计数。每组取10⁴个细胞置于流式管中,1 500 r/min离心5 min,丢弃上

清液,在PBS中洗涤1~2次。将细胞重悬于100 μ L Annexin V结合液中,然后加入1 μ L Annexin V-APC染料溶液,轻轻混合,4 $^{\circ}$ C孵育15 min,加入1 μ L PI染料溶液,轻轻混合,4 $^{\circ}$ C孵育5 min。最后,用流式细胞仪测定。

1.10 GEO数据库和GEPID2数据库 通过R语言4.4.1 GEO query包获取GSE34577数据集,并对原始数据进行背景校正和归一化,从标准化后的表达矩阵中提取TRIM28基因的表达数据,筛选出TRIM28基因在正常人样本和非M3型AML患者中的表达数据并导出数据,将此数据导入Graphpad Prism 9.5软件中进行统计分析。利用在线网站GEPID2数据库,选择生存分析,输入TRIM28基因名并选择AML,进行在线分析。

1.11 统计学处理 使用Graphpad Prism 9.5和Origin 2018对得到的实验数据进行统计分析和制图。在统计分析之前,对每组数据先进行正态性分析。对于符合正态性分布的两组数据之间的比较,使用t检验;对于不符合正态分布的,则使用非参数秩和检验。多组间数据比较,如果满足正态分布条件,则采用One-way ANOVA进行分析,并在发现统计学差异时采用Tamhane's T2 test法进行两两组间的比较;若不符合正态分布,则使用Kruskal-Wallis H检验,并在有统计学差异时进一步采用Mann-Whitney U检验进行两两组间的比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用线性回归分析统计TRIM28水平与临床指标的相关性,当 $P < 0.05$ 时,表示变量间的线性关系具有统计学意义。Pearson相关系数(r)的绝对值越大,说明相关性越强,方向由其正负号决定。

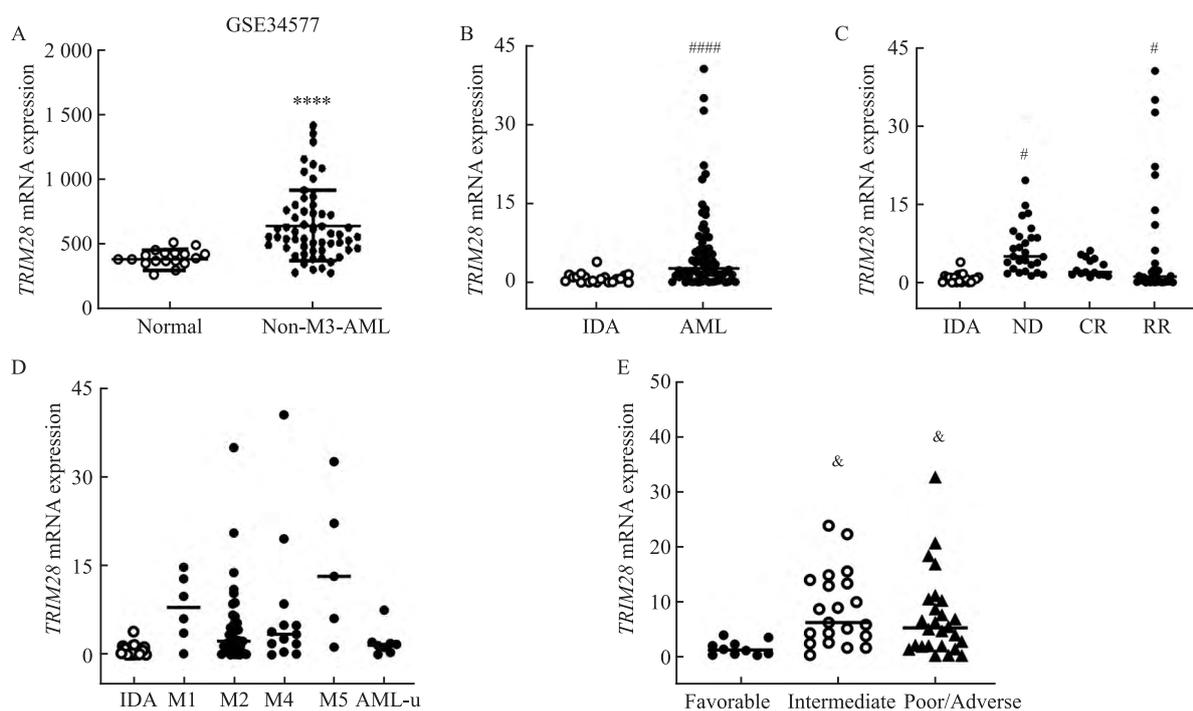
2 结果

2.1 TRIM28在非M3型AML患者中上调 为了探讨TRIM28在非M3型AML中的作用,本研究利用GEO数据库GSE34577数据集分析TRIM28的表达,结果显示TRIM28在非M3型AML患者中的表达水平明显高于对照组($P < 0.0001$)(图1A)。采用qPCR检测TRIM28在临床非M3型AML患者骨髓细胞中的表达。由于健康对照的骨髓标本难以获得,本研究选取IDA患者的骨髓标本作为对照。结果显示,TRIM28在非M3型AML患者中的表达高于IDA组,且有统计学差异($P < 0.0001$)(图1B)。此外,TRIM28在ND组和RR组中的表达高于IDA组($q =$

3.791、3.971, $P < 0.05$)(图1C),但TRIM28的表达高低与AML类型之间的差异无统计学差异(图1D)。以2025年NCCN治疗指南为参考依据,按照染色体核型与基因突变结果进行预后分层,对患者的TRIM28表达与预后分层进行相关性分析,结果表明TRIM28在遗传学风险预后分层为中等和不良组的患者中的表达高于预后良好组的患者($t = 2.790$ 、 2.318 , $P < 0.05$)(图1E)。对患者的基因突变进行进一步分析,结果如表4所示,TRIM28的表达在NPM1突变患者中升高,组间差异有统计学意义($Z = -2.003$, $P = 0.0449$),但是根据指南表示,NPM1单突变是预后良好因素,NPM1突变合并FLT3-ITD突变患者预后较差,因此将NPM1突变组的患者分为NPM1单突变组和NPM1合并FLT3-ITD突变组,统计学分析结果表明TRIM28的表达在NPM1合并FLT3-ITD突变患者中升高,但TRIM28的表达高低与NPM1单突变无明显相关性(表5)。

2.2 非M3型AML患者TRIM28水平与临床指标的相关性分析 在验证TRIM28在非M3型AML患者中的表达后,分析TRIM28表达水平与各项临床指标包括ND患者年龄、骨髓原始细胞(bone marrow blast, BM-blast)百分比、外周血原始细胞(peripheral blood blast, PB-blast)百分比、白细胞计数(white blood cell count, WBC count)、血红蛋白计数(hemoglobin count, HB count)、血小板计数(platelet count, PLT count)、白蛋白(albumin, ALB)、铁蛋白(ferritin, FE)以及乳酸脱氢酶水平(lactate dehydrogenase, LDH)之间的相关性。结果显示,TRIM28表达水平与年龄(图2A, $r = 0.5047$, $P = 0.0232$)、BM-blast比例(图2B, $r = 0.5482$, $P = 0.0123$)、PB-blast比例(图2C, $r = 0.6372$, $P = 0.0014$)、白细胞计数(图2D, $r = 0.5364$, $P = 0.0265$)呈正相关;与血红蛋白(图2E, $r = -0.4628$, $P = 0.0301$)呈负相关,与血小板(图2F)、乳酸脱氢酶(图2G)、铁蛋白(图2H)、白蛋白(图2I)无相关性(均 $P > 0.05$)。

2.3 TRIM28水平与非M3型AML患者的治疗反应率和预后相关 此外,收集首次诱导化疗CR患者和治疗无反应(non-response, NR)的患者的临床数据,并分析首次诱导化疗的治疗效果与TRIM28的相关性。结果显示,无反应组患者的TRIM28表达高于治疗有反应组(图3A, $P < 0.01$)。随后,利用GEPID2数据库验证了高TRIM28表达的非M3型AML患者的长期生存率较差(图3B, $HR = 2.9$, $P =$

图1 *TRIM28*在AML患者中的表达水平Fig. 1 The expression levels of *TRIM28* in AML patients

A: The expression level of *TRIM28* between non-M3-AML samples and normal samples in GEO database; B: Comparison of *TRIM28* expression levels in IDA and AML patients in clinical samples; C: Comparison of *TRIM28* expression levels between IDA and different group AML patients; D: Comparison of *TRIM28* expression levels between IDA and AML patients with different FAB subtypes; E: Comparison of *TRIM28* expression levels in AML patients with different genetic risk prognostic strata; **** $P < 0.0001$ vs Normal group; # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$ vs IDA group; & $P < 0.05$ vs Favorable group.

0.045)。

2.4 干扰 *TRIM28* 抑制 AML 细胞增殖, 促进细胞凋亡 为了探讨 *TRIM28* 水平对 AML 细胞功能的影响, 使用了小干扰 RNA 技术 (siRNA) 干扰 HL60 细胞 *TRIM28*。如图 4A-4C 所示, 不同序列转染后, *TRIM28* 的 mRNA 表达水平 ($t=6.68, 12.02, 10.76, 4.17$, 均 $P < 0.05$) 和蛋白表达水平均有不同程度的下降 ($t=16.25, 33.44, 37.05, 7.470$, 均 $P < 0.05$)。根据转染效率, 选择 S2、S3 序列下降程度最高, 因此用于后续实验。CCK-8 结果显示, 转染后 HL60 细胞的增殖能力下降 (图 4D, $q=2.92, 3.37$, 均 $P < 0.05$)。此外, 通过流式细胞术检测 *TRIM28* 水平对凋亡比例的影响, 发现干扰 *TRIM28* 后细胞凋亡比例增加 (图 4E, $q=4.76, 4.68$, 均 $P < 0.01$)。上述结果表明, 干扰 *TRIM28* 的表达可抑制 HL60 细胞的增殖, 促进细胞凋亡。

3 讨论

AML 是一种危害人类健康的血液系统恶性疾病, 其发病率和病死率在白血病中居首位^[2], 但大多

数 AML 病例病因尚不明确。尽管在治疗 AML 方面取得了一些有希望的进展, 但 AML 患者的预后仍然不令人满意, 其中一半以上的患者最终死于疾病。因此, 探索新的治疗靶点是非常必要的。

TRIM28 作为一种转录调节因子, 在肿瘤生物学中具有多种作用, 如在肺癌中, *TRIM28* 可与泛素连接酶 RLIM 相互作用, 促进其泛素化, 维持 p53 的低表达水平, 最终促进肿瘤细胞的增殖和生存^[8]。有研究^[9]报道, 在肝细胞癌中, 细胞核中的 *TRIM28* 与泛素偶联酶 E2 家族的成员 UBE2S 相互作用, 增强 p27 的泛素化并促进其降解, 从而调节肝细胞癌细胞的细胞周期进程。它能促进卵巢癌的迁移、侵袭和上皮间质转化过程^[5, 10]。此外, *TRIM28* 还参与了肿瘤细胞的凋亡^[11]和自噬^[12]过程。然而, 其在 AML 中的表达和分子作用研究较少。

本研究在 GEO 数据库 GSE34577 中验证了非 M3 型 AML 样本中 *TRIM28* 的表达水平, 结果显示其在 AML 中显著高于对照组。进一步检测 *TRIM28* 在临床非 M3 型 AML 骨髓样本中的表达, 以 IDA 患者的骨髓样本为对照组。qPCR 结果与数据库结果一

表4 TRIM28 mRNA 表达与非 M3型 AML 患者基因突变的关系
Tab. 4 Association of TRIM28 mRNA expression with gene mutations in non-M3 AML patients

Genetic mutation	n (Total=63)	TRIM28 [M (P ₂₅ , P ₇₅)]	Z value	P value
<i>FLT3-ITD</i> mutation status				
Mutant	14	4.312 (1.721, 12.970)	-0.678	0.5073
Non-mutant	49	3.805 (0.699, 8.593)		
<i>NPM1</i> mutation status				
Mutant	9	9.894 (3.746, 14.370)	-2.003	0.0449
Non-mutant	54	2.553 (0.471, 7.810)		
<i>ASXL1</i> mutation status				
Mutant	2	2.752 (0.122, 5.381)	-0.666	0.5417
Non-mutant	61	3.805 (1.259, 9.353)		
<i>RUNX1</i> mutation status				
Mutant	6	4.772 (1.368, 12.210)	-0.398	0.7062
Non-mutant	57	3.805 (1.128, 8.707)		
<i>CEBPα</i> mutation status				
Mutant	7	1.295 (0.186, 20.620)	-0.525	0.6146
Non-mutant	56	4.027 (1.345, 8.760)		
<i>TET2</i> mutation status				
Mutant	4	0.838 (0.116, 17.070)	-0.902	0.3891
Non-mutant	59	3.884 (1.278, 8.813)		
<i>TP53</i> mutation status				
Mutant	3	1.886 (0.114, 5.381)	-0.871	0.4107
Non-mutant	60	3.844 (1.250, 9.624)		
<i>DNMT3A</i> mutation status				
Mutant	7	2.679 (1.295, 7.552)	-0.306	0.7726
Non-mutant	56	4.027 (1.071, 9.624)		
<i>ETO</i> mutation status				
Mutant	5	4.595 (2.189, 13.570)	-0.712	0.4958
Non-mutant	58	3.543 (1.185, 8.924)		
<i>KIT</i> mutation status				
Mutant	7	4.595 (1.919, 8.813)	-0.722	0.4854
Non-mutant	56	3.543 (1.071, 9.571)		
<i>IDH2</i> mutation status				
Mutant	8	1.773 (1.084, 6.898)	-0.764	0.4584
Non-mutant	55	3.884 (1.241, 9.894)		

表5 NPM1单突变与NPM1合并FLT3-ITD突变患者TRIM28表达水平的比较

Tab. 5 Comparison of TRIM28 expression between patients with NPM1 mutation alone and those with NPM1 plus FLT3-ITD mutation

Group	n	TRIM28 [M (P ₂₅ , P ₇₅)]	Compare the P value with	
			Non-mutant	NPM1 mutation
<i>NPM1</i> mutation	2	2.409 (1.014, 3.805)	0.804	
<i>NPM1</i> with <i>FLT3-ITD</i> mutation	7	12.870 (4.938, 15.450)	0.047	0.184
Non-mutant	54	2.553 (0.471, 7.810)		0.804

致,显示非 M3 型 AML 组 TRIM28 表达水平高于 IDA 组,而不同 FAB 亚型 AML 患者之间无统计学差异,根据 2025 年 NCCN 治疗指南进行遗传学风险分层,结果发现 TRIM28 在中等和不良预后组患者中的表达高于良好预后组。基因突变分析显示,TRIM28 在 NPM1 突变患者中表达升高,但进一步分组发现,这

种高表达主要出现在 NPM1 合并 FLT3-ITD 突变患者,而在 NPM1 单突变患者中无显著差异。提示 TRIM28 高表达可能与 NPM1 合并 FLT3-ITD 所代表的不良预后特征相关。

此外,ND 组的 TRIM28 表达水平高于 CR 组和 RR 组;这在一定程度上表明 TRIM28 在 AML 发病阶

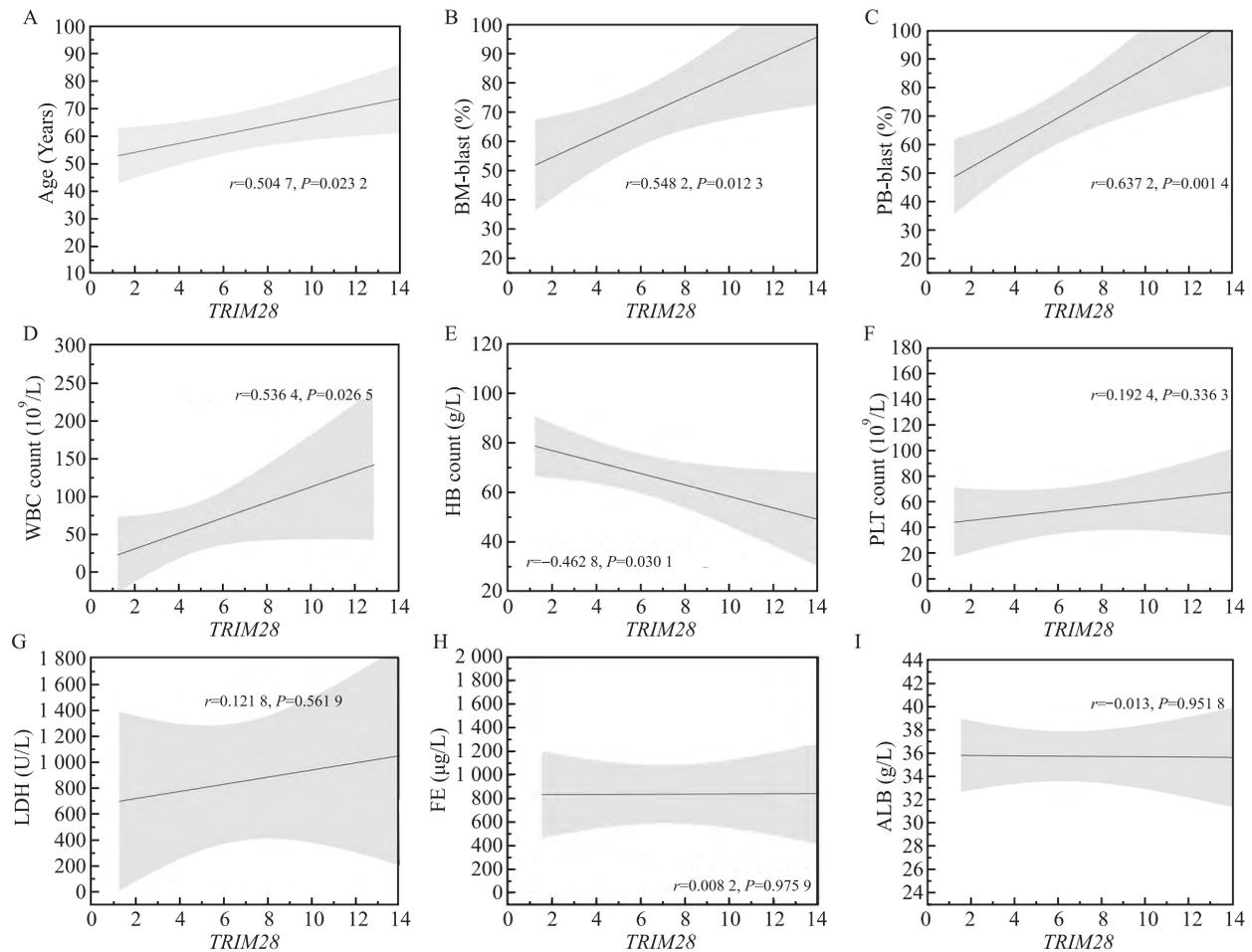


图2 非M3型AML患者TRIM28表达水平与临床的相关性分析指标

Fig. 2 Correlation analysis between TRIM28 expression level of non-M3 AML patients and clinical indicators

A-I: Correlation analysis between TRIM28 expression level with Age, BM-blast, PB-blast, WBC count, HB count, PLT count, LDH, FE and ALB level of non-M3 AML patients in ND group.

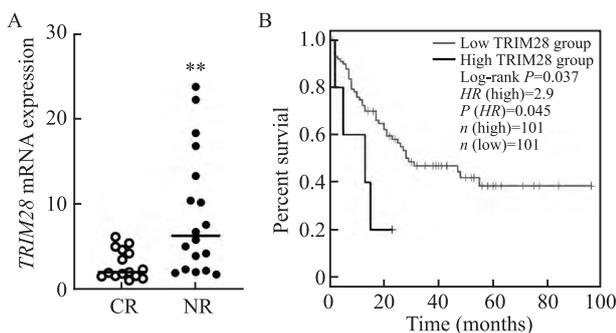


图3 非M3型AML患者TRIM28水平与治疗有效率及预后的关系

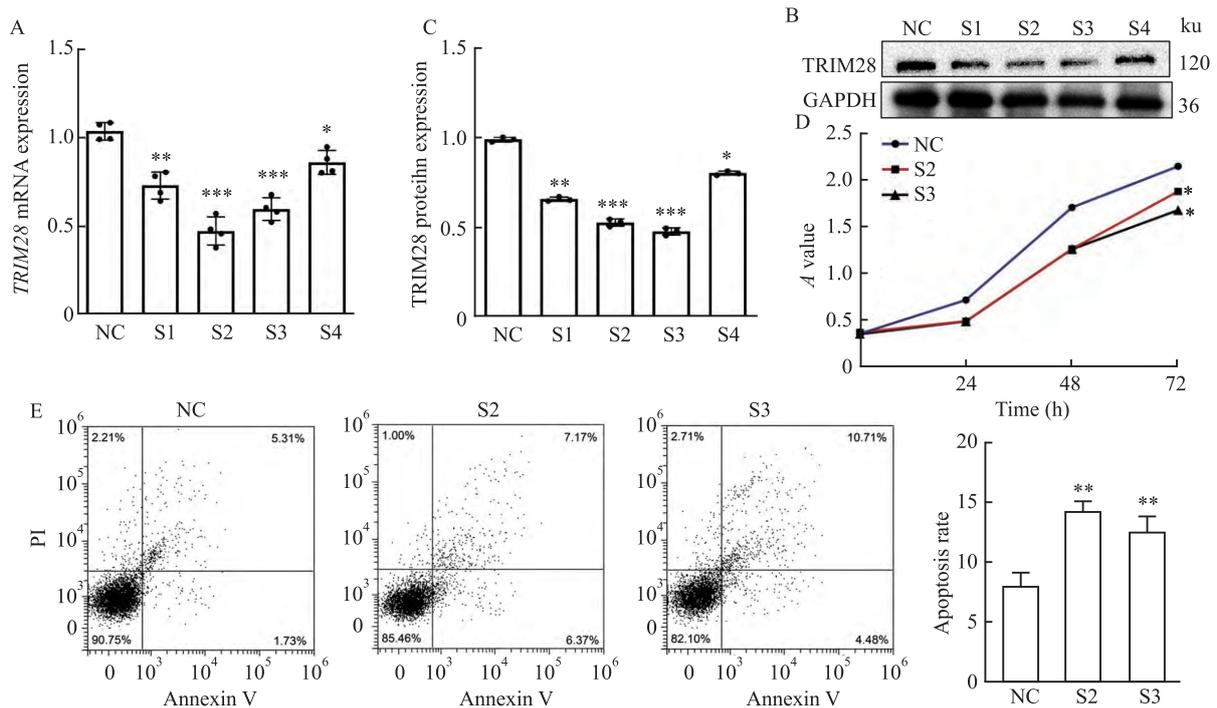
Fig. 3 Relationship of TRIM28 level and treatment response rate and prognosis in non-M3 AML patients

A: Relationship between TRIM28 levels and treatment response rates of patients with non-M3 AML; B: Kaplan-Meier curves of TRIM28 on survival in GEPIA2 database; ** $P < 0.01$ vs CR group.

段起着关键作用。相关性分析结果显示,TRIM28表达水平与患者年龄、ND时外周血和骨髓原始细胞比例、白细胞计数呈正相关。结合2022年欧洲白血

病联盟建议,预测AML初诊断时TRIM28的高表达可能与不良预后相关。此外,在随访结果统计中,发现首次诱导化疗失败的NR患者中TRIM28的表达高于首次诱导化疗成功的患者。结合生存分析结果显示TRIM28高表达组患者的长期生存较差,最终得出TRIM28高表达与不良预后密切相关。

为了进一步阐明TRIM28水平对AML细胞功能的影响,采用小干扰技术干扰TRIM28的表达水平。实验结果表明,TRIM28敲低后,AML细胞增殖能力降低,凋亡比例增加。出现这一现象可能是因为TRIM28可以维持癌细胞的干性,并作为E3泛素连接酶发挥作用,促进细胞增殖或抗增殖活性^[13]。一项在胃癌中的研究^[14]提示,TRIM28通过调控泛素化过程,增加程序性死亡受体-配体1(PD-L1)表达,并抑制T细胞活化以促进肿瘤生长。Tan et al^[15]研究结果显示,TRIM28可通过上调miR-125b-5p,抑制

图4 干扰 *TRIM28* 效率验证及对 AML 细胞增殖和凋亡的影响Fig. 4 Interference with *TRIM28* efficiency validation and its effects on AML cell proliferation and apoptosis

A-C: The expression of *TRIM28* mRNA and protein in HL60 cells treated with different interfering sequences; D: The effects of interfering with *TRIM28* on the proliferation of HL60 cells; E: The effects of interfering with *TRIM28* on The apoptosis of HL60 cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group.

CREB1 表达,从而诱导顺铂耐药。这些虽源自其他肿瘤,但与本研究观察到的 AML 细胞中 *TRIM28* 的表达影响肿瘤细胞生存的现象高度一致。

参考文献

- [1] Shimony S, Stahl M, Stone R M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2023, 98(3): 502-26. doi: 10.1002/ajh.26822.
- [2] DiNardo C D, Erba H P, Freeman S D, et al. Acute myeloid leukaemia [J]. Lancet, 2023, 401(10393): 2073-86. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00108-3.
- [3] Niu J, Peng D, Liu L. Drug resistance mechanisms of acute myeloid leukemia stem cells [J]. Front Oncol, 2022, 12: 896426. doi: 10.3389/fonc.2022.896426.
- [4] Mohammadi A, Pour Abbasi M S, Khorrani S, et al. The TRIM proteins in cancer: from expression to emerging regulatory mechanisms[J]. Clin Transl Oncol, 2022, 24(3): 460-70. doi: 10.1007/s12094-021-02715-5.
- [5] Yang Y, Tan S, Han Y, et al. The role of tripartite motif-containing 28 in cancer progression and its therapeutic potentials [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1100134. doi: 10.3389/fonc.2023.1100134.
- [6] Huang N, Sun X, Li P, et al. TRIM family contribute to tumorigenesis, cancer development, and drug resistance[J]. Exp Hematol Oncol, 2022, 11(1): 75. doi: 10.1186/s40164-022-00322-w.
- [7] Czerwińska P, Mazurek S, Wiznerowicz M. The complexity of *TRIM28* contribution to cancer[J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 63. doi: 10.1186/s12929-017-0374-4.
- [8] Jin J O, Lee G D, Nam S H, et al. Sequential ubiquitination of p53 by *TRIM28*, RLM1, and MDM2 in lung tumorigenesis[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(6): 1790-803. doi: 10.1038/s41418-020-00701-y.
- [9] Zhang R Y, Liu Z K, Wei D, et al. UBE2S interacting with *TRIM28* in the nucleus accelerates cell cycle by ubiquitination of p27 to promote hepatocellular carcinoma development[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 64. doi: 10.1038/s41392-020-00432-z.
- [10] 范蒙蒙, 李丛, 梁雪, 等. 转录因子 SOX4 对卵巢颗粒细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1646-51. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.006.
- [10] Fan M M, Li C, Liang X, et al. Effect of the transcription factor SOX4 on the proliferation, migration and apoptosis of ovarian granulosa cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(10): 1646-51. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.006.
- [11] Chen Z, Song J, Xie L, et al. N6-methyladenosine hypomethylation of circGPATCH2L regulates DNA damage and apoptosis through *TRIM28* in intervertebral disc degeneration [J]. Cell Death Differ, 2023, 30(8): 1957-72. doi: 10.1038/s41418-023-01190-5.
- [12] Song T, Lv S, Ma X, et al. *TRIM28* represses renal cell

- carcinoma cell proliferation by inhibiting TFE3/KDM6A-regulated autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299 (5) : 104621. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104621.
- [13] Han W Y, Wang J, Zhao J, et al. WDR4/*TRIM28* is a novel molecular target linked to lenvatinib resistance that helps retain the stem characteristics in hepatocellular carcinomas [J]. *Cancer Lett*, 2023, 568: 216259. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216259.
- [14] Ma X, Jia S, Wang G, et al. *TRIM28* promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1) : 246. doi: 10.1038/s41392-023-01450-3.
- [15] Tan Q, Ma J, Zhang H, et al. miR-125b-5p upregulation by *TRIM28* induces cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through CREB1 inhibition [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22 (1) : 469. doi: 10.1186/s12890-022-02272-9.

Prognostic significance of *TRIM28* elevation in non-M3 acute myeloid leukemia

Gong Siqi¹, Li Cong¹, Fan Mengmeng¹, Wang Huiping¹, Zhang Wanqiu¹, Liang Xue¹,
Tao Qianshan¹, Hong Qiang², Zhai Zhimin¹

(¹ Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

² School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To clarify the expression of *TRIM28* in non-M3 acute myeloid leukemia (AML) and its correlation with clinical indicators and prognosis, and to further explore the effect of *TRIM28* expression levels on the proliferation and apoptosis of AML cells using small interfering RNA. **Methods** The GSE34577 dataset was analyzed using R software to compare *TRIM28* expression between healthy controls and non-M3 acute myeloid leukemia (AML) patients. Clinical samples from non-M3 AML patients were collected, with *TRIM28* expression levels measured using real-time quantitative PCR (qPCR). The analysis focused on correlations between *TRIM28* expression and various clinical indicators, treatment efficacy, and patient prognosis. Furthermore, small interfering RNA (siRNA) technology was employed to downregulate *TRIM28* expression in human primary AML cells (HL60 cell line). The effects on cell proliferation and apoptosis were then assessed through CCK-8 assays and flow cytometry, respectively. **Results** The results showed that *TRIM28* was up-regulated in non-M3 AML of both online database GSE34577 and clinical samples ($P < 0.0001$), *TRIM28* expression of new diagnosis group and relapsed refractory group was higher than iron deficiency anemia group ($P < 0.01$), and there was no significance between different French-American-British classification systems subtype. *TRIM28* expression was higher in non-M3 AML patients with a poor genetic prognosis stratified as moderate than in the good prognosis group, and *TRIM28* expression was associated with *NPM1* combined with the *FLT3-ITD* mutation, positively correlated with age, bone marrow blast, peripheral blood blast and white blood cell, negatively correlated with hemoglobin. In addition, interference *TRIM28* greatly inhibited cell proliferation and promoted cell apoptosis. **Conclusion** This study reveals that *TRIM28* is highly expressed in non-M3 AML and associated with prognosis, and plays a key role in the proliferation and apoptosis of AML cells, suggesting that *TRIM28* may serve as a novel therapeutic target for non-M3 AML.

Key words non-M3 acute myeloid leukemia; *TRIM28*; proliferation; apoptosis; recurrence; prognosis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82370225); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053176); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-B08)

Corresponding author Zhai Zhimin, E-mail: zzzm889@163.com